

## クローン性造血と新型コロナウイルス感染心筋炎

和文抄録；新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) は、軽症の感冒症状から多臓器障害まで多彩な症状を引き起こすが、心筋障害を来した患者の予後が不良であることが知られている。しかし、心筋障害をきたす要因は十分に解明されていない。一方、クローン性造血は、造血幹細胞の遺伝子変異によって特定のクローンが優勢になる現象で、炎症を介して心血管疾患を助長する。本研究では、COVID-19の重症化にクローン性造血が関与している可能性を検討した。COVID-19患者24人を対象にクローン性造血の頻度と臨床的意義を解析した結果、約6割にクローン性造血遺伝子変異を検出し、その中でTET2遺伝子変異が高頻度に認められた。そこで、TET2変異の有無に基づき2群に分けて比較した結果、患者背景に有意差はなかったが、TET2群では心筋トロポニンTとBNPが高く、人工呼吸器Free期間が短い傾向があった。さらに、心筋障害群では補体・凝固系の活性化が示唆され、TET2群ではTATやPICが有意に高値を示した。以上の結果は、TET2変異を伴うクローン性造血がCOVID-19患者の心筋障害や人工呼吸器使用率に影響を及ぼす可能性を示唆しており、これらの所見を確立するためにはさらなる検証が必要である。

※ ※※  
由良 義充, 春日井大介

## 緒 言

新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) に伴う心筋炎は、高齢者を中心に高頻度 (5～20%) で発生しており、心筋炎を起こした患者の予後が不良であることが報告されている (Shi S et al. JAMA Cardiol. 2020)。この病態の機序は十分には解明されていないが、ウイルスの心筋細胞への直接感染、感染に伴う免疫応答反応によるサイトカインストーム、微小血栓が心筋傷害を引き起こすと提唱されている。高齢、肥満、併存疾患 (糖尿病、慢性腎臓病、心血管病) の既往以外には、心筋傷害の発症を予測する因子は明らかになっておらず、治療介入法も確立されていない (Flerlage T et al. Nat. Rev. Microbiol. 2021)。

一方、造血幹細胞において加齢とともに後天的に遺伝子変異 (体細胞変異) が生じ、変異細胞が増殖した状態「クローン性造血」は、疫学および実験的な検

討から心血管疾患の独立した危険因子であると報告されている (Jaiswal S et al. N. Engl. J. Med. 2017, Yura Y et al. JACC Basic Transl Sci. 2020, 図1)。このため、クローン性造血は心血管病の病因解明において重要な概念として、循環器領域で大きな注目を集めている。クローン性造血では、造血幹細胞から分化した遺伝子変異を有する自然免疫系の細胞がサイトカイン分泌の調節障害を引き起こし、その結果、心臓や血管において過剰な炎症、凝固障害、組織傷害を生じさせると考えられている。

我々は、これまでクローン性造血と心血管病に関する研究を進める中で、COVID-19に伴う心筋炎の発症および増悪機序において、クローン性造血を介した免疫細胞のサイトカイン調節障害が組織傷害や微小血栓形成を引き起こすことが重要であるとの仮説を立てた。そこで本研究では、クローン性造血がCOVID-19に伴う心筋炎に及ぼす影響を検証し、そのメカニズムを明らかにすることを目的とする。

※国立大学法人東海国立大学機構  
名古屋大学大学院医学系研究科 循環器内科  
※※名古屋大学医学部附属病院 救急科

## クローン性造血が免疫細胞を介して心血管病を起こす

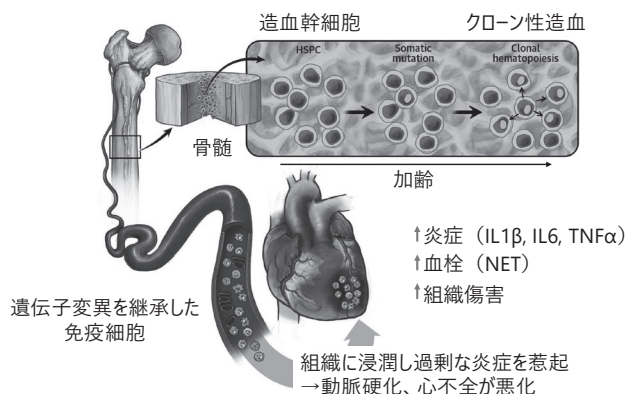


図 1

### 目 的

クローン性造血が心筋傷害および主要な臨床パラメーターに及ぼす影響を明らかにし、クローン性造血に基づいて予後不良群を同定できるかを検証する。さらに、心筋傷害を来した患者に生じる変化を検出するため、血清プロテオーム解析を実施し、クローン性造血による心筋傷害の機序を解明する。

### 方 法

本研究は、COVID-19を対象とした多施設共同前向き観察研究（主解析：Kasugai D, et al. Front Immunol. 2024）における単施設サブ解析である。解析対象は、2021年3月から2022年3月までの期間に名古屋大学医学部附属病院に入院したCOVID-19患者とした。組み入れ基準は、18歳以上であること、COVID-19に感染していること、人工呼吸管理を実施していること、生存して退院した症例であることの4点とした。除外基準は、挿管前に認知機能障害または意識障害があること、既知の精神疾患を有することの2点を設定した。主要評価項目は「人工呼吸器離脱までの期間」と定義し、登録後28日間において呼吸補助を必要としなくなった最初の日を回復日とした。副次評価項目として、心筋トロポニンT (TnT)、脳性ナトリウム利尿ペプチド (BNP)、C反応性タンパク質 (CRP) などの各種バイオマーカーの変化を設定した。さらに、患者背景としては併存疾患、日常生活動作 (ADL)、COVID-19ワクチン接種歴などを収集した。

クローン性造血の評価について、入院時に回収した

末梢血液からDNAを抽出し、エラー修正次世代シーケンシング (NGS) を用いて遺伝子変異の有無と程度を評価した。解析対象とした遺伝子は、クローン性造血遺伝子として高頻度に報告されているエピジェネティック修飾因子 (DNMT3A, TET2, ASXL1)、DNA障害応答因子 (TP53, PPM1D, ATM, CHK2)、スプライシング因子 (SRSF2, SF3B1) とした。本サブ解析の対象となった患者は総数24例で、平均年齢は66.5歳であった。重症度に関しては全例 (24例) で人工呼吸器管理を行い、そのうち2例はECMOを使用していた。心筋傷害は心筋トロポニンT値が0.014 ng/mL以上であることを基準とし、この定義に該当した症例は24例中14例であった。

### 結 果

(クローン性造血の頻度) COVID-19患者24名を対象にクローン性造血の頻度を解析したところ、変異アレル頻度 (variant allele frequency: VAF) を2%で設定した場合、24名中3名 (12.5%) にクローン性造血を認めた。VAFを1%に下げると6名 (25%)、さらに0.5%とした場合には15名 (62.5%) でクローン性造血を検出した。これらの結果より、検出感度を上げることでクローン性造血が高頻度に認められ、非常に小さいクローンも検出可能であることが示唆された。特に、高感度の検出手法 (VAF0.5%) を用いた場合には、約6割の患者 (15名) でクローン性造血遺伝子変異が認められ、その中でもTET2遺伝子変異 (11名) が最も多かった (図2)。遺伝子変異のタイプは、

## COVID-19患者におけるクローン性造血プロファイル、臨床パラメーター

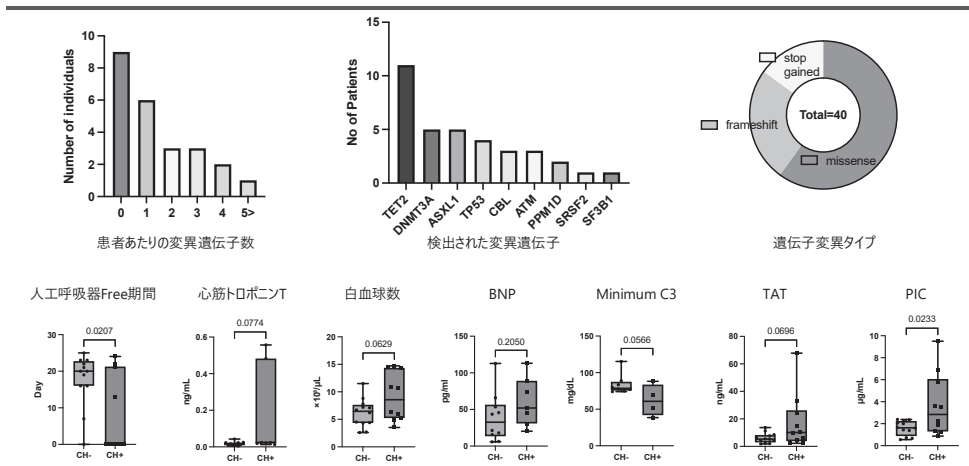


図 2

Missense 変異が 6 割を占め、続いて Frame shift 変異が 2.5 割、Stop codon 変異が 1.5 割を占めた。これまでの我々の研究を含む報告から、TET2 遺伝子変異が原因で生じるクローン性造血では炎症性免疫細胞の機能変化が生じ、病態を悪化させる可能性が指摘されている (Yura Y et al. JACC Basic Transl Sci. 2020)。したがって、本研究では TET2 クローン性造血の有無に基づき、対象患者を二群に分けて後続解析を行った。

入院時における TET2 クローン性造血陽性群と陰性群の背景を比較した結果、年齢、性別、体重、血圧などの基本情報に有意差は認められなかった。また、高血圧、糖尿病、脂質異常症、心血管疾患の既往、COVID-19 ワクチン接種歴などの併存疾患においても有意な差は検出されず、さらに全患者が人工呼吸器管理を要していた。これらのことから、両群間に顕著な背景の偏りはないと考えられた。

(臨床経過およびバイオマーカー) 各種臨床パラメーターとの関連を評価したところ、人工呼吸器フリー期間に関して、クローン性造血陰性群 (17.67 ± 7.29 日) と比較して陽性群 (8.00 ± 10.70 日) で有意に短く (p=0.0207)、TET2 クローン性造血陽性群はより臨床経過が不良であることが示唆された。また、心不全マーカーである BNP (クローン性造血陰性群: 38.88 ± 33.17 pg/mL, 陽性群: 60.53 ± 33.12 pg/mL, p=0.205) およびトロポニン T (TnT; 陰性群: 0.02 ± 0.01 ng/mL, 陽性群: 0.16 ± 0.24 ng/mL, p=0.077) のいずれも陽性群で高値を示す傾向が認められ、TET2 ク

ローン性造血陽性群では心筋傷害が進行しやすい可能性が考えられた (図 2)。

(プロテオーム解析) TET2 クローン性造血陽性群において心筋トロポニン T が高い傾向がみられたことから、心筋トロポニン T 陽性・陰性の 2 群比較の血清のプロテオーム解析を行った。合計 469 種類のタンパク質が同定され、そのうち 20 分子が陽性群において優位に上昇しており、Reactome 解析を行うと、補体および凝固活性化に関わる経路が最も有意な経路として検出された。先行研究から、COVID-19 感染においては血中の補体活性化と C3 の消耗の低下、および凝固・血栓形成の亢進が報告されている (Afzali B. et al. Nat. Rev. Immunol. 2022)。本研究でも、経時的に測定した C3 値の最低値 (MinC3) はクローン性造血陰性群 (83.83 ± 13.62 mg/dL) と比較して陽性群 (62.10 ± 21.70 mg/dL) で低い傾向を示した (p=0.0566)。さらに、TET2 クローン性造血陽性群では、TAT (thrombin-antithrombin complex; 陰性群: 6.06 ± 3.67 μg/mL, 陽性群: 17.45 ± 20.28 μg/mL, p=0.0696) および PIC (plasmin-α2 plasmin inhibitor complex; 陰性群: 1.59 ± 0.67 μg/mL, 陽性群: 3.68 ± 2.86 μg/mL, p=0.0233) がいずれも上昇しており、補体・凝固系の過剰亢進による補体消費と微小血栓形成の可能性が示された (図 2)。以上の結果を総合すると、TET2 クローン性造血陽性群では補体・凝固系の活性化が強く、心筋傷害に寄与し得る機序を示唆するデータが得られた。

考 察

本研究では、COVID-19 患者におけるクローン性造血の存在と臨床経過との関連を高精度で検証するため、エラー修正次世代シーケンス (Error-corrected NGS) 手法を用いた。クローン性造血においては変異を有する免疫細胞が 0.5 ~ 10% 程度の低頻度で存在することから、従来の高エラー率を伴う解析手法では検出感度・特異度が不足する場合が多い。本研究においては、シーケンスエラーをデータ解析の段階で補正するエラー修正シーケンスという手法を用いて、非常に小さいクローンも検出可能とした (図 3)。その結果、VAF0.5% を閾値とする高感度手法により TET2 変異を含むクローン性造血が想定以上に高頻度に認められた。

先行研究ではクローン性造血が COVID-19 の重症化を促進し得るかどうかについては一定の結論が得られていない (Bolton KL et al. Nat commun. 2021, Zhou Y et al. Blood. 2022)。我々はその主な原因として体細胞変異の検出感度に関する技術的リミテーションや臨床経過との対応関係が十分に解析されていないことが挙げられると考えている。本研究では、申請者らが開発・改良を進めてきた高精度なエラー修正 NGS を用いると同時に、重症 COVID-19 患者 (人工呼吸器管理を要した症例) を対象とした前向きコホートにおいて、クローン性造血の有無が臨床アウトカム (人工

呼吸器フリー期間、心筋傷害マーカーなど) に与える影響を詳細に評価した。その結果、TET2 変異を有する患者群では人工呼吸器使用期間が有意に長く、BNP やトロポニン T (TnT) が高値を示すなど、臨床経過が不良となる傾向が認められた。また、プロテオーム解析では補体および凝固系の活性化に関わる分子の変動が顕著であったことから、TET2 クローン性造血を介して免疫調節異常と微小血栓形成が惹起され、結果として心筋傷害および呼吸管理の長期化に寄与している可能性が示唆された。このように、クローン性造血が COVID-19 感染における重症化機序の一部を構成し得るとの視点は、循環器領域にも新たな発展をもたらすと考えられる。

一方で、被検体数が限られていることから、統計学的パワーの確保や他の変異遺伝子との相互作用の解明には、より大規模なコホートおよび詳細な機能解析が必要である。本研究の結果をさらに発展させ、クローン性造血を標的とした新規治療法開発や早期介入法を検討していくことで、COVID-19 重症化予防や心筋傷害制御に寄与できる可能性がある。

結 論

本研究において、高精度のエラー修正次世代シーケンスを用いて COVID-19 患者のクローン性造血を評価した結果、特に TET2 遺伝子変異が高頻度に検出

クローン性造血検出のための次世代シーケンス解析

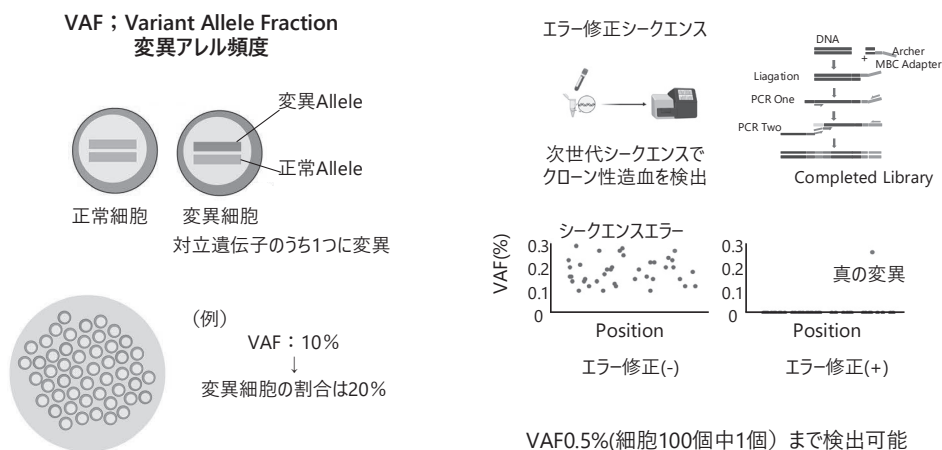


図 3

された。TET2 変異クローン性造血を有する患者群では、人工呼吸器使用期間が長く、心筋傷害マーカー (BNP, TnT) が高値を示す傾向が認められた。プロテオーム解析の結果、心筋傷害群においては、補体および凝固系の過剰亢進が示唆され、これが心筋傷害および重症化の一因である可能性が考えられた。今後は、大規模な前向き研究による再現性の検証と、クローン性造血が COVID-19 重症化に関与するメカニズムの

詳細な解明が求められる。TET2 クローン性造血を組み入れた予後不良群の早期同定に向けた応用が期待される。

#### 謝 辞

本研究は公益財団法人榊原記念財団の 2022 年度第 20 回榊原記念研究助成を受けた。研究の遂行にあたり多大なる支援を賜ったことを深く感謝申し上げます。

## CLONAL HEMATOPOIESIS AND MYOCARDIAL INJURY IN COVID-19: THE IMPACT OF TET2 MUTATIONS ON DISEASE PROGRESSION

※ ※※  
Yoshimitsu YURA, Daisuke KASUGAI

※ Nagoya University School of Medicine, Department of Cardiovascular Medicine  
※※ Department of Emergency and Critical Care Medicine, Nagoya University Hospital

COVID-19 presents a wide spectrum of symptoms, ranging from mild cold-like symptoms to multi-organ dysfunction. It is well known that patients who develop myocardial injury have a poor prognosis. However, the factors contributing to myocardial injury remain insufficiently understood. Clonal hematopoiesis is a phenomenon where certain hematopoietic stem cells in the bone marrow acquire somatic mutations, leading to an overrepresentation of these mutated cells in the bone marrow. These mutations frequently appear in genes commonly implicated in leukemia, such as DNMT3A, TET2, and ASXL1, indicating a pre-leukemic condition. Importantly, these genetic alterations are passed onto differentiated peripheral immune cells, potentially modifying their function.

In this study, we investigated the potential involvement of clonal hematopoiesis in the progression of COVID-19. We analyzed the frequency and clinical significance of clonal hematopoiesis in 24 patients with COVID-19 and detected clonal hematopoiesis-related genetic mutations in approximately 60% of them, with TET2 mutations being the most prevalent. When patients were stratified into two groups based on the presence or absence of TET2 clonal hematopoiesis, there were no significant differences in baseline characteristics. However, in the TET2 group, cardiac troponin T and BNP levels were elevated, and the ventilator-free days tended to be shorter. Furthermore, activation of the complement and coagulation systems was suggested in the myocardial injury group, with significantly higher levels of TAT and PIC observed in the TET2 group.

This study suggests that clonal hematopoiesis with TET2 mutations may influence myocardial injury and ventilator use in COVID-19 patients, highlighting the need for further validation.